

WO 03/084507

4/PRTS  
1

10/510040  
DT04 Rec'd PCT/PTO 01 OCT 2004  
PCT/DE03/01068

Patentanmeldung

Vernebelbare Liposomen und ihre Verwendung zur pulmonalen Applikation von Wirkstoffen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Liposomen, die stabil gegenüber Vernebelung und zur pulmonalen Applikation geeignet sind und die eine verzögerte Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen zeigen.

### Beschreibung

In der pharmazeutischen Technologie unterscheidet man verschiedene Arzneiformen mit protrahierter Wirkung. Sie alle haben das Ziel, eine Wirkungsverlängerung des jeweiligen Arzneistoffes zu erreichen. Man unterscheidet Langzeit-, Depot- und Retardpräparate. Die modifizierte Wirkstofffreigabe kann durch chemische Veränderungen (z.B. Salze, Ester, Komplexe), durch Zusätze (z.B. Verwendung von Hilfsstoffen), durch technologische Maßnahmen (z.B. Wahl bestimmter Korngrößen, Tablettenhärten) sowie durch Wahl des Applikationsortes oder der Applikationsart erreicht werden. In Abhängigkeit von der Art der Freigabe unterscheidet man den sustained-, repeat-prolonged-, und delayed-release-Typ.

Ein besonderes Problem stellt die Applikation von pharmazeutischen Wirkstoffen in der Lunge dar, da hier aus Verträglichkeitsgründen die Auswahl der Hilfsstoffe stark eingeschränkt und eine gezielte und kontrollierte Freisetzung schwierig zu erreichen ist.

Als toxikologisch unbedenklich gelten Liposomen, wie die bereits für andere Applikationswege zugelassenen liposomalen Produkte Daunoxome®, Ambisome®, HeparinPur® u.a. zeigen. Liposomale Formulierungen erscheinen auch für die Lunge als geeignet, da sie ganz oder zum größten Teil aus körpereigenen Substanzen hergestellt werden können, die natürlicherweise in der Lunge vorkommen.

Als Liposomen bezeichnet der Fachmann Lipidvesikel, die in ihrer Struktur körpereigenen Zellmembranen stark ähneln. Die Vesikelwände, die beispielsweise aus Phospholipiden bestehen, trennen einen wässrigen Innenraum von der ebenfalls wässrigen umgebenden Phase. Derartige Lipidvesikel können sich spontan nach thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten u.a. durch Dispersi- on von Phospholipiden in überschüssigem wässrigen Medium bilden. Zur Herstellung von Liposomen werden üblicherweise natürliche, partialsynthetische oder auch vollsynthetische Phospholipide eingesetzt. Während andere Lipide einen kegel- förmigen Molekülaufbau zeigen, der die Bildung von Mizellen favorisiert, weisen Phospholipide aufgrund der beiden Fett- säureketten eine zylindrische Geometrie auf, die in wässrigem Medium die Bildung von lamellaren Strukturen begünstigt.

Der Aufbau der einzelnen Lamellen eines Liposoms ist ähnlich dem der Zellmembran: Die Phospholipide bilden Doppelschich- ten, in denen sich die hydrophoben Molekülteile im Inneren der Doppelschicht befinden, während die hydrophilen Kopfgrup- pen in die wässrige Phase nach außen beziehungsweise innen zeigen.

Aufgrund ihrer Struktur und Größe lassen sich die Liposomen in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1).

Tabelle 1

Klassifizierung	Durchmesser	Struktur
MLV (multilamellar vesicles)	100-5000 nm	mehrere Doppelmembranen
SUV (small unilamellar vesicles)	< 100 nm	unilamellare, kleine, hydrophil gefüllte Vesikel
LUV (large unilamellar vesicles)	> 100 nm (bis 2000 nm)	unilamellare, große, hydrophil gefüllte Vesikel

Da Liposomen sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche aufweisen, können Wirkstoffe unterschiedlich eingebaut werden. Während sich lipophile Wirkstoffe in die Membran einlagern, befinden sich hydrophile Stoffe in den wässrigen Schichten der Vesikelwände oder im von den Vesikelwänden begrenzten wässrigen Innenraum der Liposomen. Amphiphile Wirkstoffe ordnen sich analog den Phospholipiden an. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Liposomenklassen bestimmen die möglichen Einsatzgebiete. So weisen SUV im Verhältnis einen hohen Anteil an Lipiden auf und eignen sich von daher vor allem für lipophile Wirkstoffe; für LUV gilt das Gegenteil, sie weisen einen verhältnismäßig großen Innenraum zur Aufnahme hydrophiler Wirkstoffe auf. Eine verzögerte Freisetzung ist am ehesten durch eine MLV-Struktur mit den vielen hintereinander geschalteten Diffusionsmembranen realisierbar.

Sowohl durch ihre biologische Verträglichkeit als auch durch die Möglichkeit einer modifizierbaren Pharmakokinetik (z.B. verzögerte Wirkstofffreisetzung) stellen Liposomen einen

vielversprechenden Ansatz für eine kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge dar.

Eine derartige kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge könnte für eine Vielzahl von Erkrankungen von erheblicher therapeutischer Bedeutung sein. Insbesondere bietet sich bei Lungenerkrankungen die Möglichkeit, Wirkstoffe direkt in das Zielorgan zu verbringen und dort eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration bei langer Wirkdauer zu erzielen. Die retardierte Wirkstofffreisetzung kann darüber hinaus zu einer Verminderung von Nebenwirkungen führen, da zum einen starke Konzentrationsschwankungen mit hohen Konzentrations-Peaks unmittelbar nach der Applikation vermieden werden, zum anderen durch die liposomale Verpackung Wirkstoffe mit kurzer biologischer Halbwertszeit Verwendung finden können, die nach Freisetzung und Wirkungsvermittlung schnell inaktiviert werden. In Gegensatz dazu können Wirkstoffe mit langer biologischer Halbwertszeit, wie sie teilweise zur Behandlung des Asthmas oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD) eingesetzt werden, über die Luft-Blut-Barriere in den Körperkreislauf gelangen und dort zu Nebenwirkungen führen. Neben den bereits erwähnten Lungen- und Atemwegserkrankungen Asthma und COPD stellen insbesondere die Lungenentzündung und der Lungenhochdruck Erkrankungen dar, die durch liposomal verpackte Wirkstoffe besser behandelt werden könnten. So sind beispielsweise derzeit in der Therapie des Lungenhochdrucks mit gefäßaktiven Substanzen (z.B. Prostazyklin oder Prostazyklinanaloge) aufgrund deren kurzen

biologischen Halbwertszeiten häufige, zum Teil stündliche Inhalationen mit einer Dauer von bis zu 15 Minuten für eine effektive und anhaltende Drucksenkung im Lungenkreislauf notwendig. Liposomale Verpackung und retardierte Freisetzung der Substanzen könnten die Inhalationshäufigkeit zum Wohle der Patienten drastisch reduzieren und gleichzeitig zu einer konstanten, auch über die Nachtphase anhaltenden, therapeutisch erwünschten Drucksenkung im Lungenkreislauf sorgen.

Neben der Anwendung bei Lungenerkrankungen ist die verzögerte und kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen auch für systemische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, von Interesse. Die Lunge ist ein Organ, das aufgrund der äußerst dünnen Grenzschicht zwischen Luft und Blut und der großen Gesamtfläche der Lungenbläschen über ein hohes Resorptionsvermögen verfügt. Daher können transpulmonal applizierte Wirkstoffe systemisch verfügbar gemacht und entsprechend zur Prophylaxe oder Therapie von systemischen Erkrankungen eingesetzt werden. Beispielsweise wird derzeit die inhalative Bolusgabe von Insulin als Alternative zur Injektion entwickelt, wobei jedoch bisher keine Formulierung zur kontinuierlichen basalen Insulinfreisetzung in den Körperkreislauf bekannt ist.

Bislang gibt es keine Depotform zur pulmonalen Applikation. Die bisher einzige Möglichkeit für eine lange Wirkdauer besteht in der Verwendung von Arzneistoffen mit entsprechend langer Halbwertszeit.

Das Standardverfahren zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die Inhalation von Aerosolen. Wirkstofftragende Ae-

rosole werden mittels geeigneter Aerosolgeneratoren erzeugt, in der Praxis übliche Geräte sind Düsen- und Ultraschallverneblung sowie Dosieraerosole und Pulverinhalatoren. Die Deposition von Aerosolen im Atemtrakt ist insbesondere abhängig von der Partikelgrößenverteilung des Aerosols. Partikel mit einem aerodynamischen Massendurchmesser von unter 6  $\mu\text{m}$  erreichen zu einem größeren Prozentsatz die Lunge mit Luftröhre, Bronchien und Alveolarbereich; zu therapeutischen Zwecken sind entsprechend Aerosole mit Partikeldurchmessern kleiner 6  $\mu\text{m}$  zu verwenden.

Wirkstoff-Formulierungen, die in wässriger Lösung vorliegen, lassen sich mit Düsen- oder Ultraschall-Aerosolgeneratoren vernebeln. Für die Anwendung mit Dosieraerosolen oder Pulverinhalatoren sind zusätzliche Modifikationen der Wirkstoff-Formulierungen notwendig (z.B. Lösung oder Suspension in Treibmitteln, Mikronisierung als Trockenpulver). Bei wässrigen liposomalen Dispersionen bietet sich in besonderer Weise die Düsen- und Ultraschallverneblung als Verfahren zur Aerosolherzeugung an. Beiden Verfahren gemeinsam ist, dass durch Einwirkung mechanischer Energie Aerosoltröpfchen aus dem Flüssigkeitskontinuum herausgelöst werden. Bei diesen Prozessen wirken Kräfte auf die zu vernebelnde Flüssigkeit und auf die suspendierten Lipidvesikel, die zu einer Beeinträchtigung der Integrität der Lipidvesikel und damit zu einer vorzeitigen Freisetzung des in die Vesikel eingeschlossenen Wirkstoffs führen können. Eine Grundvoraussetzung für die pulmonale Anwendbarkeit von liposomalen Depotformulierungen als

Aerosol ist daher eine ausreichende Stabilität der Liposomen gegenüber dem Verneblungsprozess. Die Stabilität von Liposomen gegenüber der Verneblung hängt neben den technischen Bedingungen der verschiedenen Verneblungsprozesse (Druck, Ultraschallfrequenz) insbesondere von der Liposomenart und Liposomengröße sowie von der chemischen Zusammensetzung der Liposomenmembranen ab. Eine weitere Möglichkeit zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die intratracheale Instillation. Bei dieser Methode wird ein Schlauch in die Luftröhre oder in die tieferliegenden Bronchien eingeführt und die Wirkstofflösung über diesen in den Atemtrakt verbracht. Dieses Verfahren stellt zwar wesentlich geringere Anforderungen an die Stabilität von liposomalen Formulierungen als die Verneblung, führt jedoch zu einer inhomogenen Verteilung des eingebrachten Materials in der Lunge. Darüber hinaus ist die intratracheale Instillation aufgrund ihrer Invasivität nur äußerst begrenzt einsetzbar und eignet sich nicht für eine Heim- oder Dauertherapie. Um als pulmonale Depotform geeignet zu sein, muss eine liposomale Formulierung eine ausreichende Stabilität gegenüber dem Vernebelungsprozess besitzen, mittels Vernebelungstechniken in ein lungengängiges Aerosol überführt werden können, und eine verzögerte Wirkstofffreisetzung am Zielort aufweisen. Idealerweise beginnt die Freisetzung des Wirkstoffes direkt nach der Deposition der Liposomen in der Lunge und hält über mehrere Stunden an.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine spezifische, nicht toxische Formulierung zur pulmonalen Applikation be-



reitzustellen, die vernebelbar und lungengängig ist und eine verzögerte Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen und/oder Farbstoffen nach der Deposition aufweist. Weiterhin ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen gemessen werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Formulierungen spezifischer Liposomen-bildender, endogen in der Lunge vorkommender Lipide gelöst, teilweise unter dem Zusatz von synthetischen Tensiden wie Polyethylenglykol, oder dessen Derivaten. Darüber hinaus wird mit den Merkmalen des Anspruch 10 ein Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen vorgeschlagen.

Die liposomalen Formulierungen werden nach der dem Fachmann bekannten Filmmethode hergestellt (siehe beispielsweise das Lehrbuch von R. R. C. New (Editor), Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, Reprint 1994). Als weiterer Arbeitsschritt erfolgt die Extrusion der Liposomen durch Filtermembranen sowie das Abtrennen des nichtverkapselten, freien Wirkstoffanteils durch Zentrifugation, Dialyse oder chromatographische Verfahren.

Zur Bestimmung der Effizienz der Einschlußreaktion können die Liposomen mit Methanol zerstört und anschließend die Konzentration des Wirkstoffs mittels geeigneter Methoden gemessen werden. Zur Charakterisierung der Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung wird die Liposomendispersion mittels

gängiger Aerosolgeneratoren vernebelt, das entstehende Aerosol aufgefangen und anschließend der freie und der verkapselte Anteil des Wirkstoffs bestimmt.

Die Liposomen sind überraschenderweise gut mit gängigen Düsen- und Ultraschallverneblern aerosolierbar. Beim Vernebeln der liposomalen Dispersionen findet man vergleichbare Partikelgrößenverteilungen des entstehenden Aerosols wie beim Vernebeln von isotonischer Kochsalzlösung, so dass mit geeigneten handelsüblichen Verneblern lungengängige Aerosole aus den Liposomendispersionen erzeugt werden können. (Beispiele für handelsübliche Vernebler: Düsenvernebler wie Bennett-Raindrop®, Pari LC®, Pari LL®, Ventstream®, Ultraschallvernebler wie Multisonic pro®, Pulmosonic®, Systam LS®).

#### Ausführungsbeispiele:

Tabelle 2 zeigt die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen, die aus den natürlichen Bestandteilen des Lungensurfactant Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), Sphingomyelin (SM) und dem nicht im Lungensurfactant vorkommenden Polyethylenglykol (PEG) kombiniert werden.

Tabelle 2

Liposomen-	(DPPC)	(Chol)	(PEG)	(DMPC)	(SM)
------------	--------	--------	-------	--------	------

formulierungen					
Ausführungs- beispiel 1	7	3	0,15	-	-
	7	3	0,3	-	-
	7	3	0,6	-	-
Ausführungs- beispiel 2	7	4	-	1	-
	7	4	-	2	-
	7	4	-	3	-
	7	4	-	4	-
Ausführungs- beispiel 3	7	3	-	-	2%
	7	3	-	-	4%
	7	3	-	-	6%
	7	3	-	-	8%

Die Zahlen geben das molare Verhältnis der Komponenten DPPC, Chol, PEG und DMPC an; bei SM sind Gewichtsprozent angegeben.

### Liposomenherstellung

Mit den erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe mit ausreichender Stabilität gegenüber der Verneblung verkapselt werden.

In den Ausführungsbeispielen wird als Modellwirkstoff Carboxyfluorescein verwendet, ein hydrophiler Farbstoff, der sich einfach mittels Fluoreszenzspektroskopie nachweisen läßt. Zur Herstellung der Carboxyfluorescein-Lösung (CF-Lösung) werden 100 mg 5-(6)-Carboxyfluorescein in 10 ml PBS-Puffer gelöst und der pH-Wert der CF-Lösung auf 7,4 eingestellt. Zur Liposomenherstellung nach der Filmmethode wird 150 mg Gesamtmenge an Phospholipiden (siehe Formulierungen Tabelle 2) in 40 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (70:30 Volumenverhältnis) in einem Rundkolben gelöst und das Lösungsmittel

bei 60°C im Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Der an der Innenwand des Kolbens entstehende dünne Film wird weiter 2h unter Vakuum getrocknet. Durch Zugabe von 10 ml der ebenfalls auf 60°C erwärmten CF-Lösung erfolgt die Hydratisierung des Filmes. Die entstandene Dispersion wird für 2h unter Erwärmung gerührt und vor der Extrusion einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen. Dazu wird der Rundkolben in flüssigen Stickstoff getaucht bis der Inhalt gefroren ist. Während des Auftauens bei Raumtemperatur reißen die Membranen auf, schließen zusätzliches CF ein und erhöhen dadurch die Effizienz der Verkapselung. Dieser Zyklus wird fünfmal wiederholt. Danach wird die Dispersion erneut im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Jeweils 0,5 ml der Dispersion werden 21mal durch eine Polycarbonat-Filtermembran mit einem Porendurchmesser von 1,0 µm bzw. 0,4 µm extrudiert. Die Dispersion wird anschließend bei 4°C zentrifugiert (4 x 45 min/ 4500 rpm bzw. 4 x 60 min/ 15000 rpm). Die überstehende CF-Lösung wird jeweils nach den einzelnen Zentrifugationszyklen abpipettiert und durch ein gleiches Volumen an PBS-Puffer ersetzt.

#### **Ausführungsbeispiel 1**

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol) und Polyethylenglykol (PEG) von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6.

**Ausführungsbeispiel 2**

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol) und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) von 7:4:1 bis 7:4:4.

**Ausführungsbeispiel 3**

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterin (Chol) von 7:3 als 100 Gewichtsprozent, dazu variierende Mengen an Sphingomyelin (SM) von mehr als 2%, besonders bevorzugt 2-8% Gewichtsprozent.

Ebenfalls vorteilhafte Eigenschaften haben Liposomenformulierungen mit Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterin (Chol) und Kombinationen von DMPC, SM und/oder PEG.

Die erfindungsgemäßen Liposomen haben eine Größe von 0,2 - 1,5 µm.

Tabelle 3 zeigt exemplarisch die Größe der Liposomen eines Herstellungsganges nach Extrusion durch eine Polycarbonatmembran mit 0,4 µm Porengröße, Zentrifugation und Verneblung mit einem Düsenvernebler (dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3).

Tabelle 3

Formulierungen	Liposomen durchmesser nach Extrusion [µm]	Liposomen durchmesser nach Zentrifu- gation [µm]	Liposomen durchmesser nach Düsenver- neblung [µm]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	0,57 +/- 0,01	0,58 +/- 0,01	0,51 +/- 0,01
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	0,60 +/- 0,02	0,57 +/- 0,01	0,64 +/- 0,01
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	0,65 +/- 0,01	0,68 +/- 0,02	0,70 +/- 0,01

#### Stabilität der Liposomen gegenüber Vernebelung

Zur Untersuchung der Stabilität gegenüber Vernebelung werden die durch eine 0,4 µm Polycarbonatfiltermembran extrudierten liposomalen Formulierungen mit PBS 1:10 verdünnt und jeweils 2,5 ml der erhaltenen Dispersion für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit Düsen- (betrieben mit 1 bar Druckluft) und Ultraschallverneblern (betrieben mit 10 l/min Zusatzluft) vernebelt. Das erzeugte Aerosol wird über einen Silikonschlauch (15 cm lang, 3 cm Innendurchmesser) auf eine Prallplatte aus Glas geleitet und in einem 40 ml Reagenzgefäß aufgefangen. Der freie und der gesamte Anteil an Carboxyfluorescein in den aufgefangenen Dispersionen wird fluoreszenzspektrometrisch analysiert.

Zur Bestimmung des freien Anteils an CF ( $C_{\text{frei}}$ ) werden 100  $\mu\text{l}$  der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert, 50  $\mu\text{l}$  des erhaltenen Überstandes mit PBS-Puffer 1:100 verdünnt und die CF-Konzentration im Überstand fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Zur Bestimmung des gesamten Anteils an CF ( $C_{\text{gesamt}}$ ) werden 50  $\mu\text{l}$  der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion mit 450  $\mu\text{l}$  Methanol versetzt, 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Zugabe von Methanol bewirkt dabei die Zerstörung der Liposomen und eine vollständigen Freisetzung des Farbstoffes. Nach der Zentrifugation werden 50  $\mu\text{l}$  des Überstands mit PBS 1:1000 verdünnt und die Konzentration von CF fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Der in den Liposomen verkapselte Anteil des Farbstoffes ( $C_{\text{verkapselt}}$ ) läßt sich nun einfach anhand der folgenden Formel bestimmen:

$$C_{\text{verkapselt}} = (C_{\text{gesamt}} - C_{\text{frei}}) * 100 / C_{\text{gesamt}} \quad [\%]$$

Die Untersuchungen zur Stabilität der Liposomen gegenüber Verneblung zeigen, daß 50% - 80% der Liposomen den Verneblungsprozess mit Düsen- bzw. Ultraschallverneblern als intakte Liposomen überstehen.

Tabelle 4 zeigt exemplarisch die Stabilität der Liposomen gegenüber Düsenverneblung für ausgewählte Ausführungsbeispiele (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 4$ ).

Tabelle 4

Formulierungen	Anteil an liposomal verpacktem Wirkstoff nach Verneblung [%]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	69,3 ± 1,3
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	55,7 ± 1,8
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	76,9 ± 0,7

#### Freisetzungskinetik der liposomal verpackten Wirk- und Farbstoffe am Lungenmodell

Die erfindungsgemäßen liposomalen Dispersionen werden am Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge (Seeger et al., J Appl Physiol 1986, 61:1781-1789; Seeger et al., In: Oxygen Radicals in Biological Systems, edited by L. Packer. New York: Academic Press, 1994, vol. 233:549-584) untersucht. Dabei werden Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2,5 und 3 kg mit Heparin antikoaguliert und mit einem Gemisch aus Xylocain, Ketamin, und Xylazin anaesthetisiert. Unter Beatmung mit Raumluft erfolgt eine Tracheostomie. Nach mittlerer sternaler Thorakotomie wird ein Katheter in die Pulmonalarterie eingebunden, die Aorta ligiert und die beiden Ventrikel an der Herzspitze eröffnet.



Die Perfusion der Lunge erfolgt nun mittels einer Rollerpumpe, als Perfusionsmedium wird Krebs-Henseleit-Elektrolytlösung verwendet, die zusätzlich Hydroxyethylstärke und Natrium-Bicarbonat enthält. Parallel zu der künstlichen Perfusion wird die Lunge mit einem Gemisch aus 21% Sauerstoff, 5,3% Kohlendioxid und 73,7% Stickstoff beatmet. Das Herz-Lungen-Paket wird nun vorsichtig aus der Brusthöhle präpariert und anschließend ein zweiter Katheter im linken Ventrikel mittels einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Nach Aufhängen der Lunge an einem Gewichtsmesser wird der venöse Schenkel des Perfusionsystems mit dem in das Herz eingebundenen Katheter verbunden, so dass ein geschlossener, rezirkulierender Perfusionskreislauf entsteht. Zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur wird das Perfusat auf 38°C geheizt und die frei hängende Lunge in eine beheizte Kammer verbracht.

Die Standardparameter der Lungenventilation und -perfusion sind:

- Die Lungenperfusion mittels Rollerpumpe beträgt 100 ml/min.
- Die Lungenventilation erfolgt mit einem Atemzugvolumen von 30 ml und einer Atemfrequenz von 30 min<sup>-1</sup>.
- Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) beträgt 1 mmHg.
- Der linksventrikuläre Druck wird auf 2 mmHg eingestellt.
- Das Perfusatvolumen beträgt 150 ml.

Die inhalative Applikation von Aerosolen erfolgt über ein sog. Bag-in-Box-System (Abb. 1). Dieses System besteht aus einem Düsenvernebler (1), Vorratsbeutel (2), Ventilen (3) und einem flexiblen Ballon (4, Bag), der in ein luftdichtes Glasgefäß (5, Box) eingebracht ist. Die Beatmungspumpe (6) ist an das luftdichte Glasgefäß (5) angeschlossen und vermittelt je nach Richtung des Gasflusses einen Über- oder Unterdruck auf den im Glasgefäß (5) befindlichen flexiblen Ballon (4). Das vom Düsenvernebler (1) erzeugte Aerosol wird zunächst in den Vorratsbeutel (2) geleitet. Während der Expirationsphase der Pumpe (6) wird der flexible Ballon (4) aufgrund des Unterdrucks im Glasgefäß (5) gedehnt und über ein Ventilsystem (3) mit Aerosol aus dem Vorratsbeutel gefüllt. In der darauffolgenden Inspirationsphase wird das Aerosol bei entsprechender Ventilstellung aus dem Ballon (4) in den Atemtrakt der Lunge (7) verbracht.

Zur Verneblung wird ein Düsenvernebler (Bennett-Raindrop®) verwendet, der mit Atemgasgemisch (5,3% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, 73,7% N<sub>2</sub>) bei einem Druck von 1,0 bar betrieben wird.

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik von liposomal verkapseltem Farb- oder Wirkstoff werden in einer ersten Versuchsreihe an jeder Lunge zwei aufeinanderfolgende Interventionen durchgeführt. Zunächst erfolgt die inhalative Applikation einer definierten Menge an aerosolierter CF-Lösung über einen Zeitraum von 30 Minuten, gefolgt von einer Beobachtungszeit von 90 Minuten. Nach einem Perfusatwechsel mit 1 L frischer

Elektrolytlösung wird in einem zweiten Schritt die jeweilige liposmale Dispersion ebenfalls über 30 aerosoliert, gefolgt von einer Beobachtungszeit von bis zu 270 Minuten. Während beider inhalativen Aerosolapplikationen wird die gleiche Menge an CF in der Kaninchenlunge deponiert. Freies CF tritt bekanntermaßen schnell und vollständig aus dem Alveolarraum in das Gefäßsystem der Lunge über. Durch Probenentnahmen (0,5 ml) aus dem Perfusat, die beginnend mit dem Zeitpunkt unmittelbar vor der Aerosolapplikation alle 10 Minuten erfolgen, kann der Übertritt des Farbstoff quantifiziert werden. Im Vergleich mit der unverkapselten CF-Lösung läßt sich nun die Freisetzungskinetik des in Liposomen verkapselten CF beurteilen.

Die Freisetzungskinetik des Modell-Wirkstoffs CF für die erfindungsgemäßen Formulierungen ist in den Abbildungen 2-4 dargestellt (Abb.2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen, Abb.3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen, Abb.4 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/SM-Liposomen).

Anzahl anhängende Zeichnungen: 4

**Abb. 1 Darstellung des Bag-in-Box-Systems zur Beatmung der isolierten Lunge**

Die Beatmungspumpe (6) bewegt einen flexiblen Ballon (4), der aus einem Vorratsbeutel (2) die Lunge (7) mit dem Aerosol/Atemgasgemisch versorgt. Die Füllung des Vorratsbeutels (2) erfolgt mit Aerosol, das mittels eines Düsenverneblers (1) erzeugt wird, der durch Atemgas mit 1,0 bar betrieben wird.

**Abb. 2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:DMPC = 7:4:1 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht. Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

DMPC = Dimyristoylphosphatidylcholin

**Abb. 3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:PEG = 7:3:0.3 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht.

Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

PEG = Polyethylenglykol

**Abb. 4 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/SM-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:CHOL = 7:3 + 6% Sphingomyelin mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht. Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

SM = Sphingomyelin

**Bezugszeichenliste**

- (1): Düsenvernebler
- (2): Vorratsbeutel
- (3): Ventile
- (4): flexibler Ballon
- (5): Glasgefäß
- (6): Beatmungspumpe
- (7): Lunge

**Ansprüche**

1. Liposomen, dadurch gekennzeichnet dass sie Phospholipide, Cholesterin, synthetische Tenside, sowie Wirk- und/oder Farbstoff enthalten.
2. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass sie als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin (SM) enthalten.
3. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass sie als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin (SM) enthalten und/oder als synthetisches Tensid Polyethylenglykol.
4. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Polyethylenglykol (PEG), so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6 besteht.
5. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:4:1 bis 7:4:4 besteht.
6. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Sphingomyelin (SM) so dass ein molares Verhältnis von DPPC zu Cholesterin von 7:3 mit zusätzlich 2 bis 8 Gewichtsprozent Sphingomyelin (SM) besteht.

7. Liposomen, gemäss Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet dass sie hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe enthalten.
8. Liposomen gemäss der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Partikelgröße von 0,2 - 1,5  $\mu\text{m}$  aufweisen, so daß sie mit Düsen- und Ultraschallverneblern vernebelbar und alveolargängig sind und zur Behandlung des Alveolarraumes, der großen und kleinen Bronchien und der Trachea eingesetzt werden können.
9. Verwendung von Liposomen nach Anspruch 1 bis 8 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Prävention, Diagnose und/oder Behandlung von Lungenerkrankungen und systemischen Erkrankungen.
10. Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen, gekennzeichnet durch die Schritte
  - Präparation der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge
  - Verneblung der Liposomen mit einem Vernebler- und Beatmungssystem
  - Bestimmung der Farb- und/oder Wirkstoffkonzentration im Perfusat und/oder Homogenisat der Kaninchenlunge.

Abb. 1

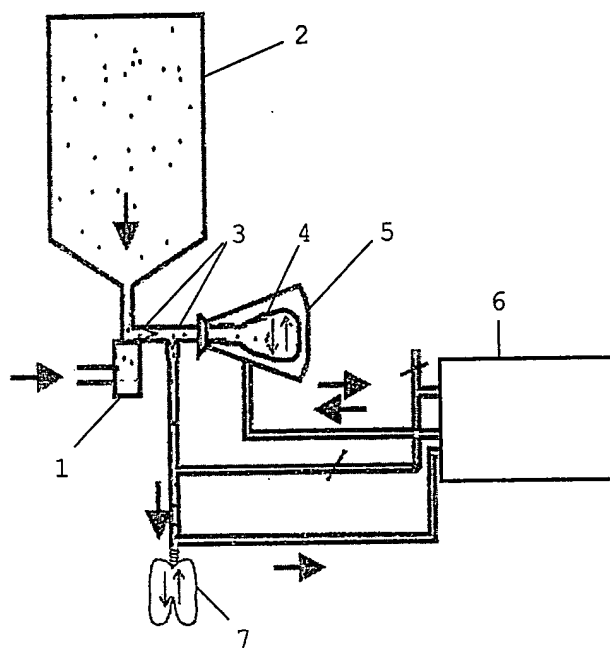




Abb. 2

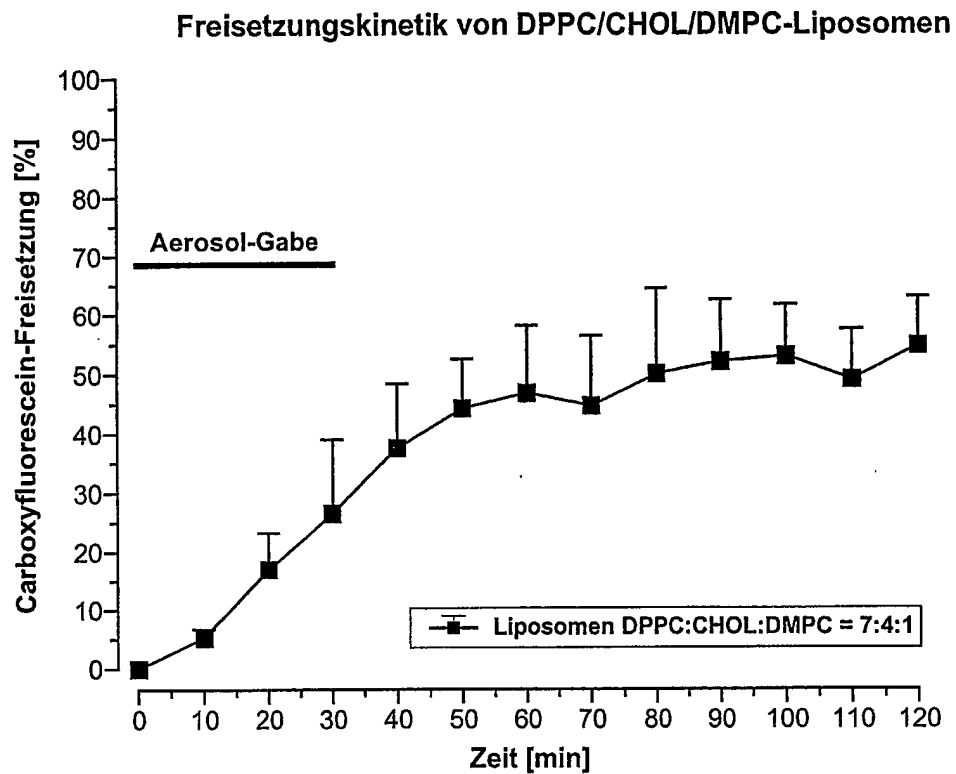


Abb. 3

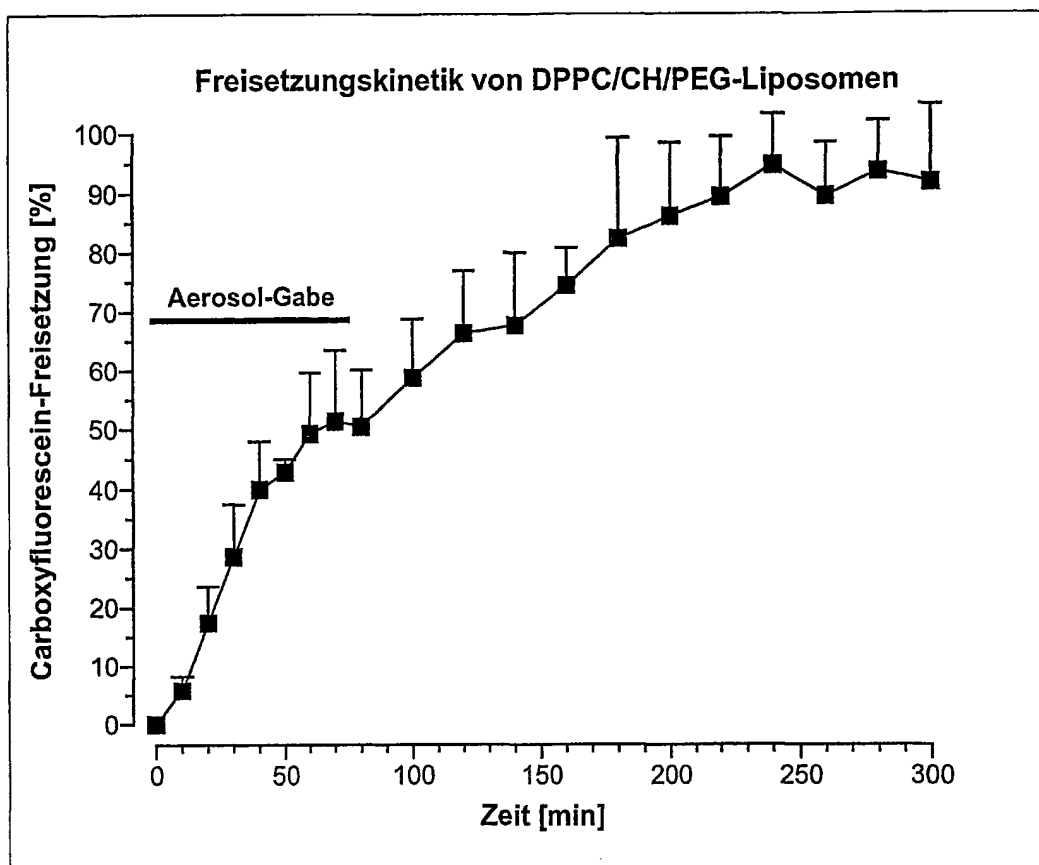
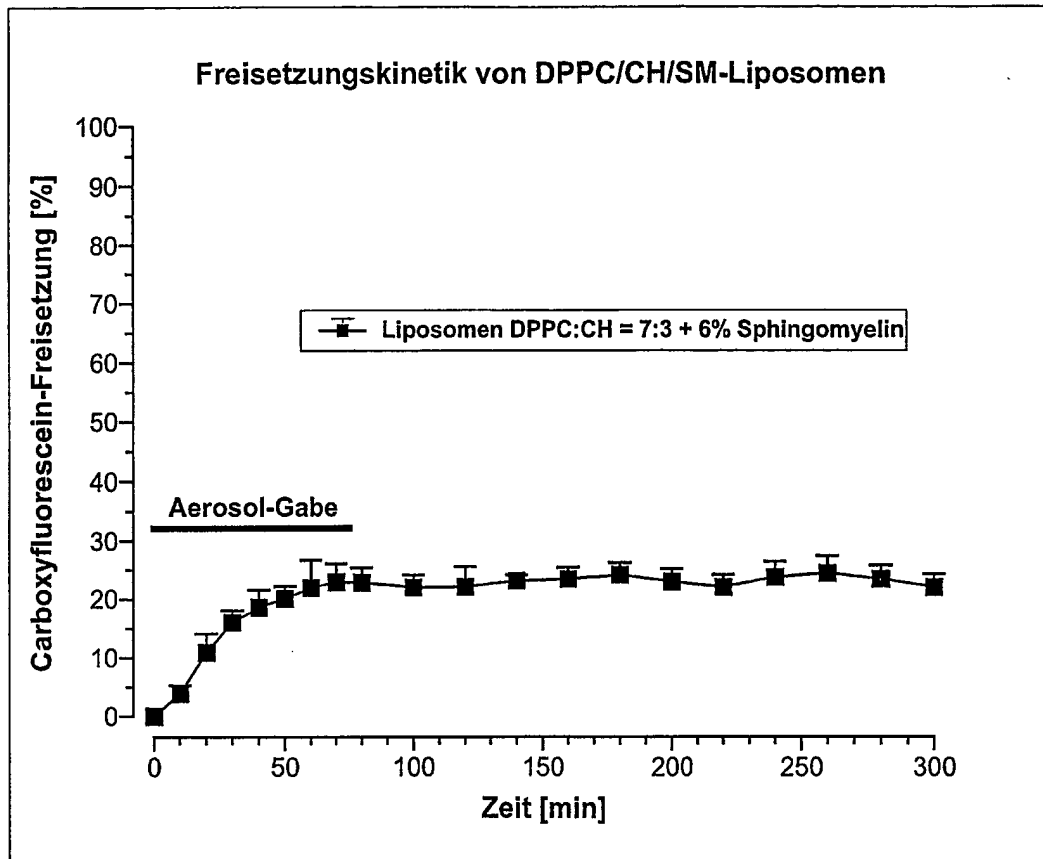


Abb. 4



**Patentanmeldung**

Erfinder:

Dr. Thomas Schmehl

5 Liebigstraße 23  
35390 Giessen

Dr. Tobias Gessler

Kirchstraße 15  
10 35435 Wettenberg

Esther Waschkowitz

Johann-Sebastian-Bach-Straße 5  
35392 Giessen

15

20 **Vernebelbare Liposomen und ihre Verwendung zur pulmonalen**  
**Applikation von Wirkstoffen**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Liposomen,  
die stabil gegenüber Vernebelung und zur pulmonalen Applikation  
25 geeignet sind und die eine verzögerte Freisetzung von  
eingeschlossenen Wirkstoffen zeigen.

### Beschreibung

In der pharmazeutischen Technologie unterscheidet man verschiedene Arzneiformen mit protrahierter Wirkung. Sie alle haben das Ziel, eine Wirkungsverlängerung des jeweiligen  
5 Arzneistoffes zu erreichen. Man unterscheidet Langzeit-, Depot- und Retardpräparate. Die modifizierte Wirkstofffreigabe kann durch chemische Veränderungen (z.B. Salze, Ester, Komplexe), durch Zusätze (z.B. Verwendung von Hilfsstoffen), durch technologische Maßnahmen (z.B. Wahl bestimmter Korngrößen,  
10 Tablettenhärten) sowie durch Wahl des Applikationsortes oder der Applikationsart erreicht werden. In Abhängigkeit von der Art der Freigabe unterscheidet man den sustained-, repeat-prolonged-, und delayed-release-Typ.

Ein besonderes Problem stellt die Applikation von  
15 pharmazeutischen Wirkstoffen in der Lunge dar, da hier aus Verträglichkeitsgründen die Auswahl der Hilfsstoffe stark eingeschränkt und eine gezielte und kontrollierte Freisetzung schwierig zu erreichen ist.

Als toxikologisch unbedenklich gelten Liposomen, wie die bereits  
20 für andere Applikationswege zugelassenen liposomalen Produkte Daunoxome®, Ambisome®, HeparinPur® u.a. zeigen. Liposomale Formulierungen erscheinen auch für die Lunge als geeignet, da sie ganz oder zum größten Teil aus körpereigenen Substanzen hergestellt werden können, die natürlicherweise in der Lunge  
25 vorkommen.

Als Liposomen bezeichnet der Fachmann Lipidvesikel, die in ihrer Struktur körpereigenen Zellmembranen stark ähneln. Die Vesikelwände, die beispielsweise aus Phospholipiden bestehen, trennen einen wässrigen Innenraum von der ebenfalls wässrigen umgebenden Phase. Derartige Lipidvesikel können sich spontan nach thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten u.a. durch Dispersion von Phospholipiden in überschüssigem wässrigen Medium bilden. Zur Herstellung von Liposomen werden üblicherweise natürliche, partialsynthetische oder auch vollsynthetische Phospholipide eingesetzt. Während andere Lipide einen kegelförmigen Molekülaufbau zeigen, der die Bildung von Mizellen favorisiert, weisen Phospholipide aufgrund der beiden Fettsäureketten eine zylindrische Geometrie auf, die in wässrigem Medium die Bildung von lamellaren Strukturen begünstigt.

Der Aufbau der einzelnen Lamellen eines Liposoms ist ähnlich dem der Zellmembran: Die Phospholipide bilden Doppelschichten, in denen sich die hydrophoben Molekülteile im Inneren der Doppelschicht befinden, während die hydrophilen Kopfgruppen in die wässrige Phase nach außen beziehungsweise innen zeigen.

Aufgrund ihrer Struktur und Größe lassen sich die Liposomen in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1).

Tabelle 1

Klassifizierung	Durchmesser	Struktur
MLV (multilamellar vesicles)	100-5000 nm	mehrere Doppelmembranen
SUV (small unilamellar vesicles)	< 100 nm	unilamellare, kleine, hydrophil gefüllte Vesikel
LUV (large unilamellar vesicles)	> 100 nm (bis 2000 nm)	unilamellare, große, hydrophil gefüllte Vesikel

5 Da Liposomen sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche aufweisen, können Wirkstoffe unterschiedlich eingebaut werden. Während sich lipophile Wirkstoffe in die Membran einlagern, befinden sich hydrophile Stoffe in den wässrigen Schichten der Vesikelwände oder im von den Vesikelwänden begrenzten wässrigen

10 Innenraum der Liposomen. Amphiphile Wirkstoffe ordnen sich analog den Phospholipiden an. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Liposomenklassen bestimmen die möglichen Einsatzgebiete. So weisen SUV im Verhältnis einen hohen Anteil an Lipiden auf und eignen sich von daher vor allem für lipophile Wirkstoffe; für LUV

15 gilt das Gegenteil, sie weisen einen verhältnismäßig großen Innenraum zur Aufnahme hydrophiler Wirkstoffe auf. Eine verzögerte Freisetzung ist am ehesten durch eine MLV-Struktur mit

den vielen hintereinander geschalteten Diffusionsmembranen realisierbar.

Sowohl durch ihre biologische Verträglichkeit als auch durch die Möglichkeit einer modifizierbaren Pharmakokinetik (z.B. 5 verzögerte Wirkstofffreisetzung) stellen Liposomen einen vielversprechenden Ansatz für eine kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge dar.

Eine derartige kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge könnte für eine Vielzahl von 10 Erkrankungen von erheblicher therapeutischer Bedeutung sein. Insbesondere bietet sich bei Lungenerkrankungen die Möglichkeit, Wirkstoffe direkt in das Zielorgan zu verbringen und dort eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration bei langer Wirkdauer zu erzielen. Die retardierte Wirkstofffreisetzung kann darüber 15 hinaus zu einer Verminderung von Nebenwirkungen führen, da zum einen starke Konzentrationsschwankungen mit hohen Konzentrations-Peaks unmittelbar nach der Applikation vermieden werden, zum anderen durch die liposomale Verpackung Wirkstoffe mit kurzer biologischer Halbwertszeit Verwendung finden können, die nach 20 Freisetzung und Wirkungsvermittlung schnell inaktiviert werden. In Gegensatz dazu können Wirkstoffe mit langer biologischer Halbwertszeit, wie sie teilweise zur Behandlung des Asthmas oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD) eingesetzt werden, über die Luft-Blut-Barriere in den Körperkreislauf 25 gelangen und dort zu Nebenwirkungen führen. Neben den bereits



erwähnten Lungen- und Atemwegserkrankungen Asthma und COPD stellen insbesondere die Lungenentzündung und der Lungenhochdruck Erkrankungen dar, die durch liposomal verpackte Wirkstoffe besser behandelt werden könnten. So sind beispielsweise derzeit in der

5 Therapie des Lungenhochdrucks mit gefäßaktiven Substanzen (z.B. Prostazyklin oder Prostazyklinanaloga) aufgrund deren kurzen biologischen Halbwertszeiten häufige, zum Teil stündliche Inhalationen mit einer Dauer von bis zu 15 Minuten für eine effektive und anhaltende Drucksenkung im Lungenkreislauf

10 notwendig. Liposomale Verpackung und retardierte Freisetzung der Substanzen könnten die Inhalationshäufigkeit zum Wohle der Patienten drastisch reduzieren und gleichzeitig zu einer konstanten, auch über die Nachtphase anhaltenden, therapeutisch erwünschten Drucksenkung im Lungenkreislauf sorgen.

15 Neben der Anwendung bei Lungenerkrankungen ist die verzögerte und kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen auch für systemische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, von Interesse. Die Lunge ist ein Organ, das aufgrund der äußerst dünnen Grenzschicht zwischen Luft und Blut und der großen Gesamtfläche der

20 Lungenbläschen über ein hohes Resorptionsvermögen verfügt. Daher können transpulmonal applizierte Wirkstoffe systemisch verfügbar gemacht und entsprechend zur Prophylaxe oder Therapie von systemischen Erkrankungen eingesetzt werden. Beispielsweise wird derzeit die inhalative Bolusgabe von Insulin als Alternative zur

25 Injektion entwickelt, wobei jedoch bisher keine Formulierung zur

kontinuierlichen basalen Insulinfreisetzung in den Körperkreislauf bekannt ist.

Bislang gibt es keine Depotform zur pulmonalen Applikation. Die bisher einzige Möglichkeit für eine lange Wirkdauer besteht in  
5 der Verwendung von Arzneistoffen mit entsprechend langer Halbwertszeit.

Das Standardverfahren zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die Inhalation von Aerosolen. Wirkstofftragende Aerosole werden mittels geeigneter Aerosolgeneratoren erzeugt, in der  
10 Praxis übliche Geräte sind Düsen- und Ultraschallverneblung sowie Dosieraerosole und Pulverinhalatoren. Die Deposition von Aerosolen im Atemtrakt ist insbesondere abhängig von der Partikelgrößenverteilung des Aerosols. Partikel mit einem aerodynamischen Massendurchmesser von unter 6  $\mu\text{m}$  erreichen zu  
15 einem größeren Prozentsatz die Lunge mit Luftröhre, Bronchien und Alveolarbereich; zu therapeutischen Zwecken sind entsprechend Aerosole mit Partikeldurchmessern kleiner 6  $\mu\text{m}$  zu verwenden.

Wirkstoff-Formulierungen, die in wässriger Lösung vorliegen,  
20 lassen sich mit Düsen- oder Ultraschall-Aerosolgeneratoren vernebeln. Für die Anwendung mit Dosieraerosolen oder Pulverinhalatoren sind zusätzliche Modifikationen der Wirkstoff-Formulierungen notwendig (z.B. Lösung oder Suspension in Treibmitteln, Mikronisierung als Trockenpulver). Bei wässrigen  
25 liposomalen Dispersionen bietet sich in besonderer Weise die

Düsen- und Ultraschallverneblung als Verfahren zur Aerosolerzeugung an. Beiden Verfahren gemeinsam ist, dass durch Einwirkung mechanischer Energie Aerosoltröpfchen aus dem Flüssigkeitskontinuum herausgelöst werden. Bei diesen Prozessen  
5 wirken Kräfte auf die zu vernebelnde Flüssigkeit und auf die suspendierten Lipidvesikel, die zu einer Beeinträchtigung der Integrität der Lipidvesikel und damit zu einer vorzeitigen Freisetzung des in die Vesikel eingeschlossenen Wirkstoffs führen können. Eine Grundvoraussetzung für die pulmonale Anwendbarkeit  
10 von liposomalen Depotformulierungen als Aerosol ist daher eine ausreichende Stabilität der Liposomen gegenüber dem Verneblungsprozess. Die Stabilität von Liposomen gegenüber der Verneblung hängt neben den technischen Bedingungen der verschiedenen Verneblungsprozesse (Druck, Ultraschallfrequenz)  
15 insbesondere von der Liposomenart und Liposomengröße sowie von der chemischen Zusammensetzung der Liposomenmembranen ab. Eine weitere Möglichkeit zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die intratracheale Instillation. Bei dieser Methode wird ein Schlauch in die Luftröhre oder in die tieferliegenden Bronchien  
20 eingeführt und die Wirkstofflösung über diesen in den Atemtrakt verbracht. Dieses Verfahren stellt zwar wesentlich geringere Anforderungen an die Stabilität von liposomalen Formulierungen als die Verneblung, führt jedoch zu einer inhomogenen Verteilung des eingebrachten Materials in der Lunge. Darüber hinaus ist die  
25 intratracheale Instillation aufgrund ihrer Invasivität nur

- äußerst begrenzt einsetzbar und eignet sich nicht für eine Heim- oder Dauertherapie. Um als pulmonale Depotform geeignet zu sein, muss eine liposomale Formulierung eine ausreichende Stabilität gegenüber dem Vernebelungsprozess besitzen, mittels
- 5 Vernebelungstechniken in ein lungengängiges Aerosol überführt werden können, und eine verzögerte Wirkstofffreisetzung am Zielort aufweisen. Idealerweise beginnt die Freisetzung des Wirkstoffes direkt nach der Deposition der Liposomen in der Lunge und hält über mehrere Stunden an.
- 10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine spezifische, nicht toxische Formulierung zur pulmonalen Applikation bereitzustellen, die vernebelbar und lungengängig ist und eine verzögerte Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen und/oder Farbstoffen nach der Deposition aufweist. Weiterhin ist es
- 15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen gemessen werden kann.
- Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Formulierungen spezifischer Liposomen-bildender, endogen in der
- 20 Lunge vorkommender Lipide gelöst, teilweise unter dem Zusatz von synthetischen Tensiden wie Polyethylenglykol, oder dessen Derivaten. Darüber hinaus wird mit den Merkmalen des Anspruch 10 ein Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen vorgeschlagen.

Die liposomalen Formulierungen werden nach der dem Fachmann bekannten Filmmethode hergestellt (siehe beispielsweise das Lehrbuch von R. R. C. New (Editor), Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, Reprint 1994). Als weiterer  
5 Arbeitsschritt erfolgt die Extrusion der Liposomen durch Filtermembranen sowie das Abtrennen des nichtverkapselten, freien Wirkstoffanteils durch Zentrifugation, Dialyse oder chromatographische Verfahren.

Zur Bestimmung der Effizienz der Einschlußreaktion können die  
10 Liposomen mit Methanol zerstört und anschließend die Konzentration des Wirkstoffs mittels geeigneter Methoden gemessen werden. Zur Charakterisierung der Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung wird die Liposomendispersion mittels gängiger Aerosolgeneratoren vernebelt, das entstehende Aerosol  
15 aufgefangen und anschließend der freie und der verkapselte Anteil des Wirkstoffs bestimmt.

Die Liposomen sind überraschenderweise gut mit gängigen Düsen- und Ultraschallverneblern aerosolierbar. Beim Vernebeln der liposomalen Dispersionen findet man vergleichbare  
20 Partikelgrößenverteilungen des entstehenden Aerosols wie beim Vernebeln von isotonischer Kochsalzlösung, so dass mit geeigneten handelsüblichen Verneblern lungengängige Aerosole aus den Liposomendispersionen erzeugt werden können. (Beispiele für handelsübliche Vernebler: Düsenvernebler wie Bennett-Raindrop®,

Pari LC®, Pari LL®, Ventstream®, Ultraschallvernebler wie Multisonic pro®, Pulmosonic®, System LS®).

### Ausführungsbeispiele:

5 Tabelle 2 zeigt die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen, die aus den natürlichen Bestandteilen des Lungensurfactant Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), Sphingomyelin (SM) und dem nicht im Lungensurfactant vorkommenden Polyethylenglykol (PEG)

10 kombiniert werden.

15 Tabelle 2

Liposomen- formulierungen	(DPPC)	(Chol)	(PEG)	(DMPC)	(SM)
Ausführungs- beispiel 1	7	3	0,15	-	-
	7	3	0,3	-	-
	7	3	0,6	-	-
Ausführungs- beispiel 2	7	4	-	1	-
	7	4	-	2	-
	7	4	-	3	-
	7	4	-	4	-
Ausführungs- beispiel 3	7	3	-	-	2%
	7	3	-	-	4%
	7	3	-	-	6%

	7	3	-	-	8%
--	---	---	---	---	----

Die Zahlen geben das molare Verhältnis der Komponenten DPPC, Chol, PEG und DMPC an; bei SM sind Gewichtsprozent angegeben.

### Liposomenherstellung

5 Mit den erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe mit ausreichender Stabilität gegenüber der Verneblung verkapselt werden.

In den Ausführungsbeispielen wird als Modellwirkstoff  
 10 Carboxyfluorescein verwendet, ein hydrophiler Farbstoff, der sich einfach mittels Fluoreszenzspektroskopie nachweisen läßt. Zur Herstellung der Carboxyfluorescein-Lösung (CF-Lösung) werden 100 mg 5-(6)-Carboxyfluorescein in 10 ml PBS-Puffer gelöst und der pH-Wert der CF-Lösung auf 7,4 eingestellt. Zur  
 15 Liposomenherstellung nach der Filmmethode wird 150 mg Gesamtmenge an Phospholipiden (siehe Formulierungen Tabelle 2) in 40 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (70:30 Volumenverhältnis) in einem Rundkolben gelöst und das Lösungsmittel bei 60°C im Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Der an der Innenwand  
 20 des Kolbens entstehende dünne Film wird weiter 2h unter Vakuum getrocknet. Durch Zugabe von 10 ml der ebenfalls auf 60°C erwärmten CF-Lösung erfolgt die Hydratisierung des Filmes. Die entstandene Dispersion wird für 2h unter Erwärmung gerührt und vor der Extrusion einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen. Dazu wird

der Rundkolben in flüssigen Stickstoff getaucht bis der Inhalt gefroren ist. Während des Auftauens bei Raumtemperatur reißen die Membranen auf, schließen zusätzliches CF ein und erhöhen dadurch die Effizienz der Verkapselung. Dieser Zyklus wird fünfmal  
5 wiederholt. Danach wird die Dispersion erneut im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Jeweils 0,5 ml der Dispersion werden 21mal durch eine Polycarbonat-Filtermembran mit einem Porendurchmesser von 1,0 µm bzw. 0,4 µm extrudiert. Die Dispersion wird anschließend bei 4°C zentrifugiert (4 x 45 min/ 4500 rpm bzw. 4 x 60 min/  
10 15000 rpm). Die überstehende CF-Lösung wird jeweils nach den einzelnen Zentrifugationszyklen abpipettiert und durch ein gleiches Volumen an PBS-Puffer ersetzt.

#### **Ausführungsbeispiel 1**

15 Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol) und Polyethylenglykol (PEG) von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6.

#### **Ausführungsbeispiel 2**

20 Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol) und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) von 7:4:1 bis 7:4:4.



### Ausführungsbeispiel 3

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterin (Chol) von 7:3 als 100 Gewichtsprozent, dazu variierende Mengen an Sphingomyelin (SM) von mehr als 2%, besonders bevorzugt 2-8% Gewichtsprozent.

Ebenfalls vorteilhafte Eigenschaften haben Liposomenformulierungen mit Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterin (Chol) und Kombinationen von DMPC, SM und/oder PEG.

Die erfindungsgemäßen Liposomen haben eine Größe von 0,2 - 1,5  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 3 zeigt exemplarisch die Größe der Liposomen eines Herstellungsganges nach Extrusion durch eine Polycarbonatmembran mit 0,4  $\mu\text{m}$  Porengröße, Zentrifugation und Verneblung mit einem Düsenvernebler (dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3).

Tabelle 3

Formulierungen	Liposomen	Liposomen	Liposomen
----------------	-----------	-----------	-----------

	durchmesser nach Extrusion [ $\mu\text{m}$ ]	durchmesser nach Zentrifugation [ $\mu\text{m}$ ]	durchmesser nach Düsenverneblun- g [ $\mu\text{m}$ ]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	0,57 +/- 0,01	0,58 +/- 0,01	0,51 +/- 0,01
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	0,60 +/- 0,02	0,57 +/- 0,01	0,64 +/- 0,01
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	0,65 +/- 0,01	0,68 +/- 0,02	0,70 +/- 0,01

### Stabilität der Liposomen gegenüber Vernebelung

Zur Untersuchung der Stabilität gegenüber Vernebelung werden die durch eine 0,4  $\mu\text{m}$  Polycarbonatfiltermembran extrudierten liposomalen Formulierungen mit PBS 1:10 verdünnt und jeweils 2,5 ml der erhaltenen Dispersion für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit Düsen- (betrieben mit 1 bar Druckluft) und Ultraschallverneblern (betrieben mit 10 l/min Zusatzluft) vernebelt. Das erzeugte Aerosol wird über einen Silikonschlauch (15 cm lang, 3 cm Innendurchmesser) auf eine Prallplatte aus Glas geleitet und in einem 40 ml Reagenzgefäß aufgefangen. Der freie und der gesamte Anteil an Carboxyfluorescein in den aufgefangenen Dispersionen wird fluoreszenzspektrometrisch analysiert.

Zur Bestimmung des freien Anteils an CF ( $C_{\text{frei}}$ ) werden 100  $\mu\text{l}$  der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion in einem Eppendorfgesäß zentrifugiert, 50  $\mu\text{l}$  des erhaltenen Überstandes mit PBS-Puffer 1:100 verdünnt und die CF-Konzentration im Überstand  
 5 fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Zur Bestimmung des gesamten Anteils an CF ( $C_{\text{gesamt}}$ ) werden 50  $\mu\text{l}$  der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion mit 450  $\mu\text{l}$  Methanol versetzt, 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Zugabe von Methanol bewirkt dabei die Zerstörung der Liposomen und eine vollständigen  
 10 Freisetzung des Farbstoffes. Nach der Zentrifugation werden 50  $\mu\text{l}$  des Überstands mit PBS 1:1000 verdünnt und die Konzentration von CF fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Der in den Liposomen verkapselte Anteil des Farbstoffes ( $C_{\text{verkapselt}}$ ) läßt sich nun einfach anhand der folgenden Formel bestimmen:

15

$$C_{\text{verkapselt}} = (C_{\text{gesamt}} - C_{\text{frei}}) * 100 / C_{\text{gesamt}} \quad [\%]$$

Die Untersuchungen zur Stabilität der Liposomen gegenüber Verneblung zeigen, daß 50% - 80% der Liposomen den  
 20 Verneblungsprozess mit Düsen- bzw. Ultraschallverneblern als intakte Liposomen überstehen.

Tabelle 4 zeigt exemplarisch die Stabilität der Liposomen gegenüber Düsenverneblung für ausgewählte Ausführungsbeispiele  
 25 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 4$ ).

Tabelle 4

Formulierungen	Anteil an liposomal verpacktem Wirkstoff nach Verneblung [%]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	69,3 ± 1,3
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	55,7 ± 1,8
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	76,9 ± 0,7

## 5 Freisetzungskinetik der liposomal verpackten Wirk- und Farbstoffe am Lungenmodell

Die erfindungsgemäßen liposomalen Dispersionen werden am Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge (Seeger et al., J Appl Physiol 1986, 61:1781-1789; Seeger et al.,

- 10 In: Oxygen Radicals in Biological Systems, edited by L. Packer. New York: Academic Press, 1994, vol. 233:549-584) untersucht. Dabei werden Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2,5 und 3 kg mit Heparin antikoaguliert und mit einem Gemisch aus Xylocain, Ketamin, und Xylazin anaesthesiert. Unter Beatmung mit Raumluft
- 15 erfolgt eine Tracheostomie. Nach mittiger sternaler Thorakotomie wird ein Katheter in die Pulmonalarterie eingebunden, die Aorta ligiert und die beiden Ventrikel an der Herzspitze eröffnet.

Die Perfusion der Lunge erfolgt nun mittels einer Rollerpumpe,  
5 als Perfusionsmedium wird Krebs-Henseleit-Elektrolyt-lösung  
verwendet, die zusätzlich Hydroxyethylstärke und Natrium-  
Bicarbonat enthält. Parallel zu der künstlichen Perfusion wird  
die Lunge mit einem Gemisch aus 21% Sauerstoff, 5,3% Kohlendioxid  
und 73,7% Stickstoff beatmet. Das Herz-Lungen-Paket wird nun  
10 vorsichtig aus der Brusthöhle präpariert und anschließend ein  
zweiter Katheter im linken Ventrikel mittels einer  
Tabaksbeutelnaht fixiert. Nach Aufhängen der Lunge an einem  
Gewichtsmesser wird der venöse Schenkel des Perfusionssystems mit  
dem in das Herz eingebundenen Katheter verbunden, so dass ein  
15 geschlossener, rezirkulierender Perfusionskreislauf entsteht. Zur  
Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur wird das  
Perfusat auf 38°C geheizt und die frei hängende Lunge in eine  
beheizte Kammer verbracht.

Die Standardparameter der Lungenventilation und -perfusion sind:

- 20 - Die Lungenperfusion mittels Rollerpumpe beträgt  
100 ml/min.
- Die Lungenventilation erfolgt mit einem Atemzugvolumen von  
30 ml und einer Atemfrequenz von 30 min<sup>-1</sup>.
- Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) beträgt  
25 1 mmHg.

- Der linksventrikuläre Druck wird auf 2 mmHg eingestellt.
- Das Perfusatvolumen beträgt 150 ml.

Die inhalative Applikation von Aerosolen erfolgt über ein sog.  
5 Bag-in-Box-System (Abb. 1). Dieses System besteht aus einem  
Düsenvernebler (1), Vorratsbeutel (2), Ventilen (3) und einem  
flexiblen Ballon (4, Bag), der in ein luftdichtes Glasgefäß (5,  
Box) eingebracht ist. Die Beatmungspumpe (6) ist an das  
luftdichte Glasgefäß (5) angeschlossen und vermittelt je nach  
10 Richtung des Gasflusses einen Über- oder Unterdruck auf den im  
Glasgefäß (5) befindlichen flexiblen Ballon (4). Das vom  
Düsenvernebler (1) erzeugte Aerosol wird zunächst in den  
Vorratsbeutel (2) geleitet. Während der Expirationsphase der  
Pumpe (6) wird der flexible Ballon (4) aufgrund des Unterdrucks  
15 im Glasgefäß (5) gedehnt und über ein Ventilsystem (3) mit  
Aerosol aus dem Vorratsbeutel gefüllt. In der darauffolgenden  
Inspirationsphase wird das Aerosol bei entsprechender  
Ventilstellung aus dem Ballon (4) in den Atemtrakt der Lunge (7)  
verbracht.

20 Zur Verneblung wird ein Düsenvernebler (Bennett-Raindrop®)  
verwendet, der mit Atemgasgemisch (5,3% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, 73,7% N<sub>2</sub>) bei  
einem Druck von 1,0 bar betrieben wird.

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik von liposomal verkapseltem  
25 Farb- oder Wirkstoff werden in einer ersten Versuchsreihe an

jeder Lunge zwei aufeinanderfolgende Interventionen durchgeführt. Zunächst erfolgt die inhalative Applikation einer definierten Menge an aerosolierter CF-Lösung über einen Zeitraum von 30 Minuten, gefolgt von einer Beobachtungszeit von 90 Minuten. Nach  
5 einem Perfusatwechsel mit 1 L frischer Elektrolytlösung wird in einem zweiten Schritt die jeweilige liposmale Dispersion ebenfalls über 30 aerosoliert, gefolgt von einer Beobachtungszeit von bis zu 270 Minuten. Während beider inhalativen Aerosolapplikationen wird die gleiche Menge an CF in der  
10 Kaninchenlunge deponiert. Freies CF tritt bekanntermaßen schnell und vollständig aus dem Alveolarraum in das Gefäßsystem der Lunge über. Durch Probenentnahmen (0,5 ml) aus dem Perfusat, die beginnend mit dem Zeitpunkt unmittelbar vor der Aerosolapplikation alle 10 Minuten erfolgen, kann der Übertritt  
15 des Farbstoff quantifiziert werden. Im Vergleich mit der unverkapselten CF-Lösung läßt sich nun die Freisetzungskinetik des in Liposomen verkapselten CF beurteilen.

Die Freisetzungskinetik des Modell-Wirkstoffs CF für die  
20 erfindungsgemäßen Formulierungen ist in den Abbildungen 2-4 dargestellt (Abb.2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen, Abb.3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen, Abb.4 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/SM-Liposomen).

25 Anzahl anhängende Zeichnungen: 4

5

**Abb. 1 Darstellung des Bag-in-Box-Systems zur Beatmung der isolierten Lunge**

Die Beatmungspumpe (6) bewegt einen flexiblen Ballon (4), der aus einem Vorratsbeutel (2) die Lunge (7) mit dem  
 10 Aerosol/Atemgasgemisch versorgt. Die Füllung des Vorratsbeutels (2) erfolgt mit Aerosol, das mittels eines Düsenverneblers (1) erzeugt wird, der durch Atemgas mit 1,0 bar betrieben wird.

**Abb. 2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:DMPC = 7:4:1 mit  
 15 Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht. Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den  
 20 Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

DMPC = Dimyristoylphosphatidylcholin

25



**Abb. 3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:PEG = 7:3:0.3 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert  
 5 ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht.

Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung

10 aus n = 3 Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

PEG = Polyethylenglykol

**Abb. 4 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/SM-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:CHOL = 7:3 + 6% Sphingomyelin  
 15 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht.

Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten  
 20 initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung

aus n = 3 Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

SM = Sphingomyelin

25

**Bezugszeichenliste****(1): Düsenvernebler****(2): Vorratsbeutel****(3): Ventile**5 **(4): flexibler Ballon****(5): Glasgefäß****(6): Beatmungspumpe****(7): Lunge**10 **Ansprüche**

1. Liposomen, dadurch gekennzeichnet dass sie Phospholipide, Cholesterin, synthetische Tenside, sowie Wirk- und/oder Farbstoff enthalten.

2. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass sie  
 15 als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide  
 Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC),  
 Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin  
 (SM) enthalten.

3. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass sie  
 20 als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide  
 Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC),  
 Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin  
 (SM) enthalten und/oder als synthetisches Tensid  
 Polyethylenglykol.

25 4. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend  
 Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und

Polyethylenglykol (PEG), so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6 besteht.

5. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und  
5 Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:4:1 bis 7:4:4 besteht.
6. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und  
10 Sphingomyelin (SM) so dass ein molares Verhältnis von DPPC zu Cholesterin von 7:3 mit zusätzlich 2 bis 8 Gewichtsprozent Sphingomyelin (SM) besteht.
7. Liposomen, gemäss Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet dass sie hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe enthalten.
- 15 8. Liposomen gemäss der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Partikelgröße von 0,2 - 1,5  $\mu\text{m}$  aufweisen, so daß sie mit Düsen- und Ultraschallverneblern vernebelbar und alveolargängig sind und zur Behandlung des Alveolarraumes, der großen und kleinen Bronchien und der  
20 Trachea eingesetzt werden können.
9. Verwendung von Liposomen nach Anspruch 1 bis 8 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Prävention, Diagnose und/oder Behandlung von Lungenerkrankungen und systemischen Erkrankungen.

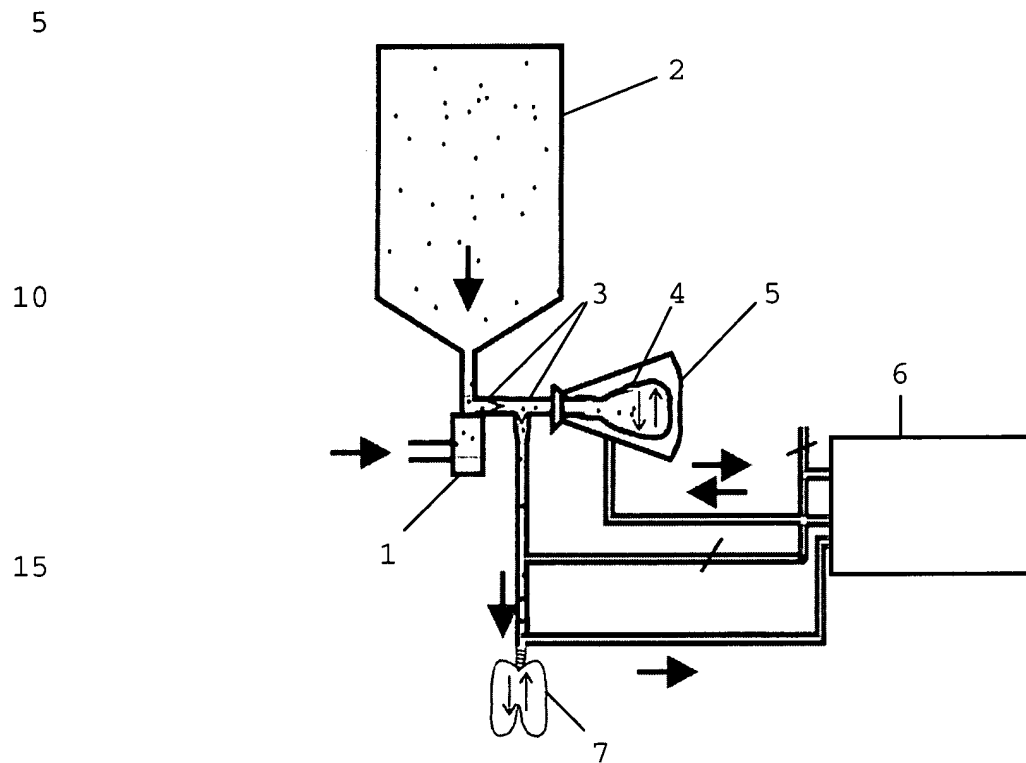
10. Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen, gekennzeichnet durch die Schritte

- Präparation der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge
- 5 - Verneblung der Liposomen mit einem Vernebler- und Beatmungssystem
- Bestimmung der Farb- und/oder Wirkstoffkonzentration im Perfusat und/oder Homogenisat der Kaninchenlunge.

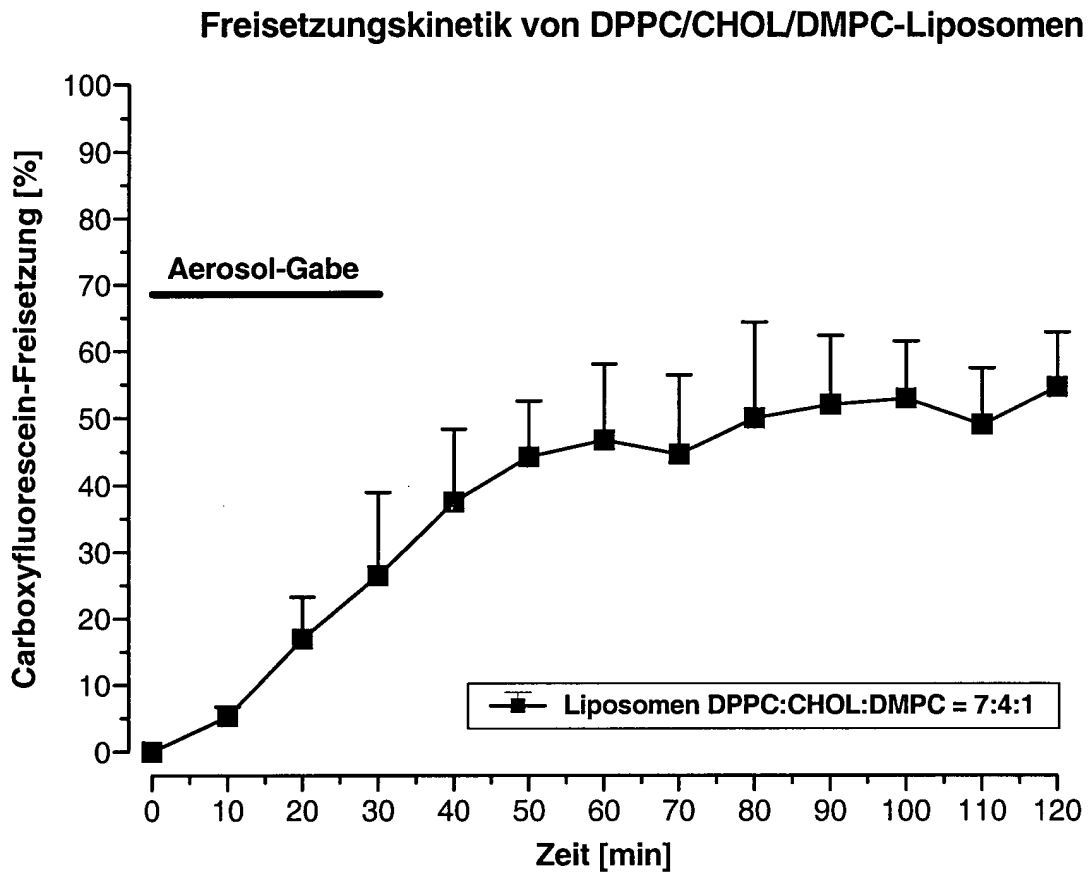
**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von spezifischen Liposomen zur pulmonalen Applikation von Arzneistoffen. Die aus den Stoffen DPPC und Cholesterin im 5 molaren Verhältnis von 7:3 bzw. 7:4 formulierten Liposomen werden durch nicht-toxische Zusätze wie Sphingomyelin, Dimyristoylphosphatidylcholin und/oder Polyethylenglykol ergänzt, sind stabil gegenüber Vernebelung mit handelsüblichen Verneblern und weisen gleichzeitig eine verzögerte Freisetzungskinetik des 10 Wirkstoffes auf.

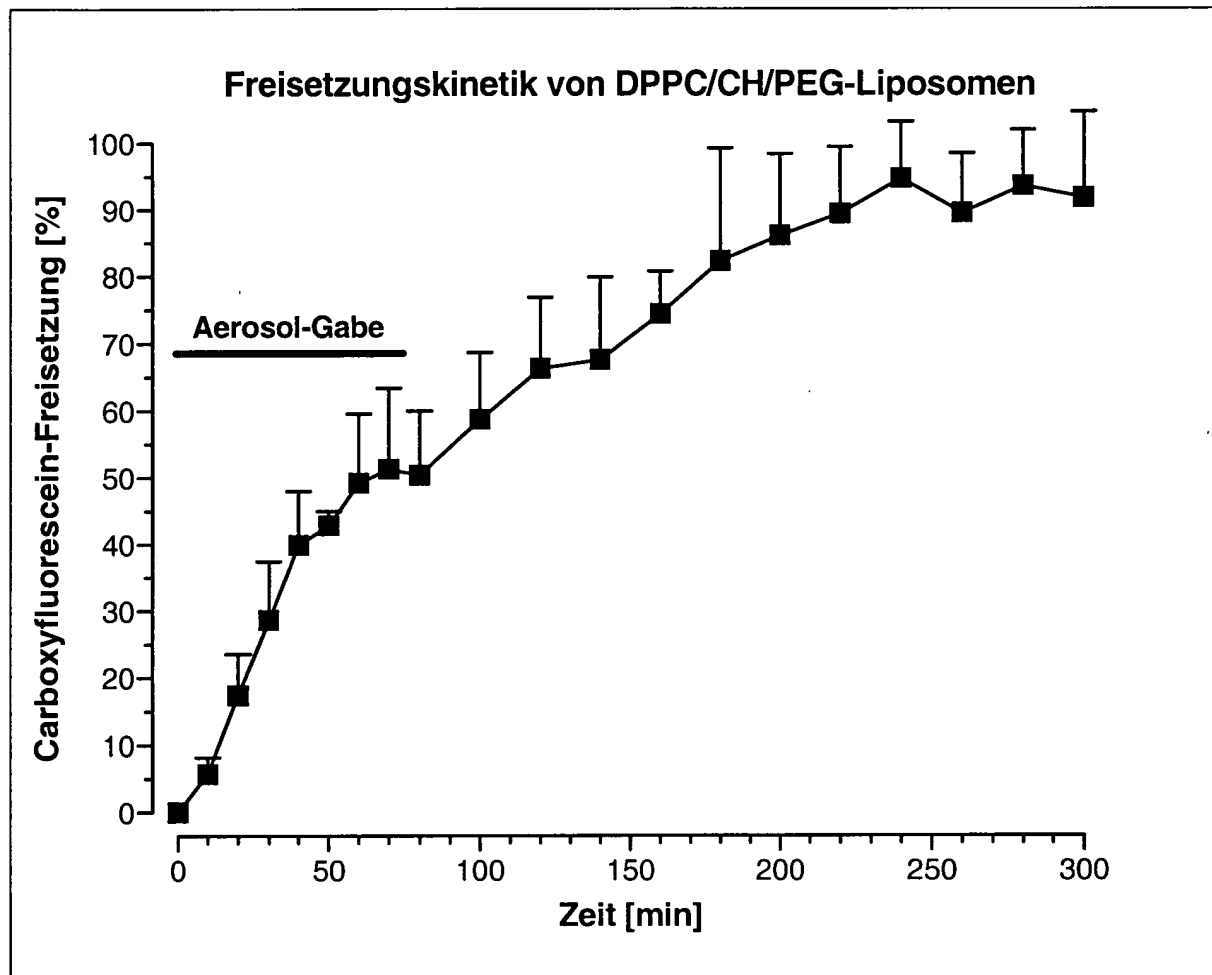
Abb. 1



5 Abb. 2



5 Abb. 3





5

Abb. 4

10

